

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

特公昭 3 9 - 2 9 8 5

Patent No	Kind	Date of Publication
JP 6 4 0 0 2 9 8 5	B	March 23, 1964

Patent Assignee: Takeda Chemical Industries Ltd.

Claim:

1. A process for producing cellulase, which comprises culturing *Aspergillus saitoi* Sakaguchi, Iizuka et Yamazaki, AM 2232 strain in a medium to form and accumulate cellulase in the culture medium and recovering the cellulase therefrom.

セルラーゼの製造法

特 願 昭 36-86598
出 願 日 昭 36.10.9
発 明 者 松村親
京都市北区小山中溝町18番地8
同 前島一孝
豊中市曾根東町1の82
同 吉野弘
大阪市都島区都島北通8の5
出 願 人 武田薬品工業株式会社
大阪市東区道修町2の27
代 表 者 三宅馨
代 理 人 弁理士 松居祥二

発明の詳細な説明

本発明はセルラーゼの製造法に関する。

セルラーゼは繊維素を分解する酵素として広範囲の用途をもち、数種の微生物の生産物中に存在することが知られているがその量は一般に少なく、大量生産に関する報告はほとんどみられない。

本発明者らは微生物を利用するセルラーゼの工業的大量生産法について研究を重ね、とりわけ糸状菌について広範囲にわたってセルラーゼ生産の有無、生産条件、採取法、酵素の種類および活性などについての実験してきたが、従来セルラーゼの生産については全く知見のなかつたアスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus saitoi* Sakaguchi

Iizuka et Yamazaki A M 2232) 菌 (坂口臨一郎 飯塚 広、山崎千二: 応用菌学、第8巻 (昭和24年) 第8号、65頁) を培養するときわめて多量に強力なセルラーゼが培養物中に蓄積され、その培養物またはその処理物から工業的有利にセルラーゼを採取しうることを知つた。

本発明はこの新知見に基づくアスペルギルス・サイトイ菌を培養して培養物中にセルラーゼを生成蓄積させ、その培養物またはその処理物からセルラーゼを採取することを特徴とするセルラーゼの製造法である。

セルラーゼはリーズの図式 (エルビン・デー・リーズ: アブライド・マイクロバイオロジー、第4巻 (1956年)、第89頁) に従えば、天然セルローズセルラーゼ⁰、線状セルローズ鎖セルラーゼ⁰、セルビオーズ⁰、β-グルコシダーゼ (A, B, O等) グルコースのように多糖系からなっている。

アスペルギルス・サイトイ菌は従来からセルラーゼ生産菌として知られている例えばアスペルギルス・ニグル (*Aspergillus niger*) 菌、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) 菌またはリゾプス・オリゼー (*Rhizopus oryzae*) 菌などにくらべて液体培養できわめて多量のセルラーゼを生産する能力を有しているばかりでなくセルラーゼ構成酵素群にも多くの優れた特徴を有する。アスペルギルス・サイトイ菌の生産するセルラーゼと上記既知のセルラーゼ生産菌の生産するセルラーゼの基質に対する作用を調べて比較した結果を第1表に示す。

第 1 表

セルラーゼの種類	セルローズ粉末 : 天然セルローズ	カルゴキシメチルセルローズ : 線状セルローズ鎖	サリシス: セロビオーズ と 同 系 基 質
アスペルギルス・サイトイ セルラーゼ	15.2%	100	109.09
アスペルギルス・ニグル セルラーゼ	0	100	2.22
アスペルギルス・オリゼー セルラーゼ	0	100	6.67
リゾプス・オリゼー セルラーゼ	0	100	痕 跡

注 カルゴキシメチルセルローズ、サリシン分解は生成糖量でこれを表わし、カルゴキシメチルセルローズを100として比較した。セルローズ粉末の分解はこれを重量法で測定し、その分解率をかかげた。

すなわちアスペルギルス・サイトイのセルラーゼは他の種類のセルラーゼにくらべいずれの基質に対しても強力に作用し、とりわけ天然繊維素に驚異的な作用を有する。このセルラーゼの安定かつ活性のpHは4.0付近にあり、また本発明の製品は保存性がよく粉末製品は長期の保存に耐えるなど消化剤として有利だけでなくその他の応用面も著しく広い。このような強力なセルラーゼの生産はアスペルギルス・サイトイを培養してはじめて工業生産することができるので、この事実は従来全く知られなかつたところである。

本発明の方法においてはアスペルギルス・サイトイ菌が培養され、培養基は液体培養基でも固体培養基でもよいが、工業的規模の生産には液体培養基を用いるのが有利である。

培養基に含まれる栄養源としては、窒素源として例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コンスチ

ーブリカー、ペプトン、肉エキス、大豆粉、綿実粉、小麦粉などの無機物、有機物などが、炭素源として例えば可溶性澱粉、デキストリン、乳糖、シヨ糖、ブドウ糖、蜜糖などが用いられ、また場合によつては鉱物質として例えばカルシウム塩類、マグネシウム塩類、カリウム塩類なども用いられる。その他微量の無機金属塩類、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。一般にアンモニウム塩類、マグネシウム塩類、リン酸カリウム等を添加すると良好な結果が得られる。

またセルラーゼの基質である例えばセルローズ粉末、カルボキシメチルセルローズなどを少量添加すると酵素の生産量が増加する。これらの培養基組成の差によるセルラーゼ生成単位を比較検討したところ、例えば第2表に示すような結果が得られた。

第 2 表

炭 素 源	窒 素 源	コンスーブリカー	大 豆 粕	綿 実 粕	グルテンミール
		8 %	1.5%	1.5%	1.5%
可溶性澱粉	5 %	—	4090	1815	500
デキストリン	"	1490	1220	1920	1250
乳 糖	"	488	825	598	1690
シヨ糖	"	1800	795	880	1050
ブドウ糖	"	2880	—	850	—
蜜 糖	"	8150	8010	9200	10600
			8 %	8 %	8 %
蜜 糖	8 %		20800	18000	16400
"	5 %		21800	19000	18100
"	8 %		16850	15700	10600

基本培地：硫酸アンモニウム 0.2 %、第一リン酸カリウム 0.2 %、硫酸マグネシウム 0.1 %、pH6.0、28°C、110時間、振盪培養

注 単位はシモギ・ネルソン法〔宇井理生：化学の領域、第84巻（昭和38年）第25頁〕

これらの実験結果からアスペルギルス・サイトイのセルラーゼ生産量は、例えば大豆粕8%、蜜糖15%、硫酸アンモニウム0.2%、第一リン酸カリウム0.2%、硫酸マグネシウム0.1%の組成の培養基を用いるときとりわけ大となること

がわかる。培養温度は80°C前後がよく、一般に液体培養基を用いる振盪培養で約110時間、タンク培養で120時間前後でセルラーゼの菌体外生産蓄積量が最高に達する。この条件下ではセルラーゼはあまり菌体内に残らない。これは菌の培養

経過にともなつて生成した酵素が順次菌体外に排泄されて安定に蓄積保存されていく結果によると考えられる。したがつてこのような酵素生成経過をとる生産菌株の場合にかぎつて本発明のように高単位の酵素生産が可能となる。

このように本発明の方法における使用菌はセルラーゼ生成機構に特徴があり、そのためセルラーゼの生産量がきわめて高く、セルラーゼの工業的大量生産上有利である。

上記したようにアスペルギルス・サイトイ菌を培養するときわめて高い収率でセルラーゼを含有する培養物が得られる。

本発明の方法においては、さらにこのアスペルギルス・サイトイ菌のセルラーゼを含有する培養物からセルラーゼが採取される。採取は本発明の方法で生産されるセルラーゼの性質を利用して行いうる。

本発明の方法で得られるセルラーゼは水溶性で有機溶媒および濃厚な塩類水溶液には難溶性であり、水溶性は pH 8-5 付近で安定であるが、その他の pH においても比較的安定である。また、本品は沈澱剤で沈澱し、等電点沈澱、吸着脱着、透析、電気泳動など酵素精製の常法によつても精製できる。すなわち、例えば本発明の方法で得られるセルラーゼ含有液に硫酸アンモニウムを約 60~70% 飽和まで、または水溶性有機溶媒を約 60~65% 濃度まで添加するとセルラーゼが沈澱しこの濃度において各溶液に可溶性の不純物と分別しうる。

本発明の方法で得られるセルラーゼは、他種のセルラーゼにくらべてはるかに強力な活性をもち培養濾液を硫酸アンモニウム沈澱法で析出させるだけでも、第 8 表のように優れた効力を示す。

第 8 表

セルラーゼの種類	セルラーゼの単位 u/mg
本発明の製品	2250
アスペルギルス・ニゲルの製品	58
アスペルギルス・オリゼーの製品	46
リゾプス・オリゼーの製品	70

注 各試料中には濾過助剤(ハイフローズーパーセル)を含んでいる。

上記のセルラーゼ活性は下記のようにして算出された。すなわち、pH4.0・0.05 モル酢酸緩衝液にカルボキシメチルセルローズ 0.5% を溶解し、これに検体を加えて 45°C に 1 時間放置した場合に生成する還元糖をグルコースとみなして定量しその糖 118 mcg/mg を生成するとき 10 単位とする。

実施例 1

大豆粕 8%、糠糖蜜 5%、硫酸アンモニウム 0.2%、第一リン酸カリウム 0.2%、硫酸マグネシウム 0.1% からなる液体培養基 100 l を 200 l 培養タンクに仕込み約 180°C で 25 分間蒸気滅菌する。その後温度を 28°C に保持し、アスペルギルス・サイトイ菌を接種して、通気量 50% のもとに攪拌培養すると 120 時間で培養液 (pH8.5) 中のセルラーゼ生産量は、80000 u/ml となる。

pH7.0 に調節した菌体を濾別後濾液に工業用硫酸アンモニウム 65% を加え、室温で 1 時間かき混ぜた後、濾過助剤(ハイフローズーパーセル) 1 kg を添加、濾過して硫酸アンモニウム沈澱物をうる。本品を 85°C で 8~12 時間通風乾燥すれば 2000 u/mg を示す褐色粗粉末 978 g が得られる。

実施例 2

実施例 1 と同様にして培養、処理して得た 200g の 2000 u/mg セルラーゼ粉末を 5°C 以下の水 600 ml によく溶解して濾過する。

濾液 570 ml、8451824 u/mg N を濃縮するために硫酸アンモニウムを 0.68 飽和とし、少量の助剤を加えて濾過すると沈澱粉 98 g が得られる。本品を水に溶解して濾過し、濾液 881 ml に活性炭 8% を加えて濾過洗浄すると、脱色された酵素

(4)

特公 昭 89 - 2985

液 868 ml, 644120 u/mg N が得られる。硫酸アンモニウムを用いて粉末化とすると、濾過助剤を含まない 117681 u/mg を示す白色精製粉末 8.1 g が得られる。

特許請求の範囲

1. アスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus*

saitoi Sakaguchi, Iizuka et Yamazaki, A.M. 2282) 菌を培養して培養物中にセルラーゼを生成蓄積させ、培養物からセルラーゼを採取することを特徴とするセルラーゼの製造法。